

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860033

研究課題名(和文) TICAM-1シグナロソーム構成因子の同定、及び機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of TICAM-1-signalosome components

研究代表者

舟見 健児 (Funami, Kenji)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：00421983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫を活性化する2重鎖RNAの受容体であるTLR3は、アダプター分子TICAM-1を介してシグナルを伝達する。本研究では、TLR3を介した刺激によるシグナル伝達の間として形成される分子集合体である、TICAM-1シグナロソームに含まれる分子を探索した。この結果、細胞質に存在するタンパク質である14-3-3-zetaが、TICAM-1シグナロソーム形成を助ける機能を持っており、TICAM-1を介した炎症性サイトカインや1型インターフェロンの産生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

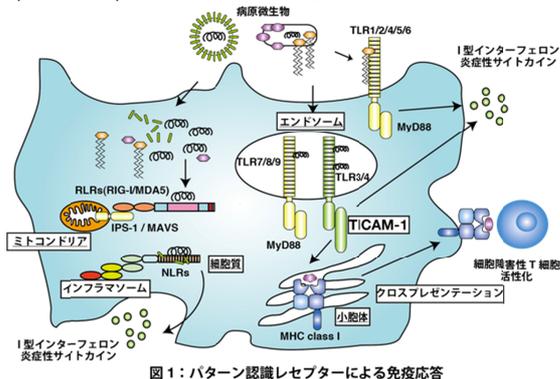
研究成果の概要(英文)：TLR3 recognizes double-stranded RNA and mediate innate immune response. TICAM-1 acts as adaptor molecule for TLR3-mediated downstream signaling. In this study, we searched components of TICAM-1-signalosome, which is a protein complex acted as scaffold for TICAM-1-mediated innate immune signal transduction. Some proteins was identified as TICAM-1-signalosome components. From these, 14-3-3-zeta, a cytosolic proteins, was indispensable for TICAM-1-mediated inflammatory cytokine production and type I interferon production. Furthermore, 14-3-3-zeta is associated with TICAM-1-signalosome formation. These result suggested that 14-3-3-zeta is a novel component in TICAM-1-signalosome.

研究分野：免疫生物学

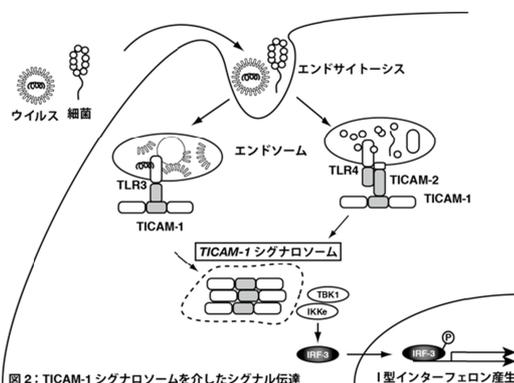
キーワード：TICAM-1 TLR3 自然免疫 インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は、リンパ球の活性化よりも刺激後速やかに活性化し(1) リンパ球よりも特異性の低いリガンド認識機構を持ち(2) リンパ球の活性化を誘導する(3) 生体防御機構として 1990 年台に提唱された。自然免疫を活性化する受容体には、Toll-like receptor (TLR), RIG-I-like receptor (RLR), Nod-like Receptor (NLR), C-type lectin receptor (CLR)が含まれる。自然免疫を活性化するリガンドとしては、微生物由来の Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)、種々のストレスによって誘導される Damage-associated molecular patterns (DAMPs)が知られている。



我々の研究室は、ウイルス由来の二重鎖 RNA を PAMPs として認識する TLR3 が、細胞内部にシグナルを伝達するために必須のアダプター分子として、TICAM-1 を同定した(図1)。TICAM-1 は、TLR3 が刺激を受けて活性化すると、TIR ドメインを介して TLR3 と会合し、下流において転写因子の IRF-3・NF-kappaB・AP-1 を活性化し、I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの産生誘導やクロスプレゼンテーションを介した細胞障害性 T 細胞の活性化に重要な役割を担っている。また、細菌由来の LPS をリガンドとして認識する TLR4 を介したシグナル伝達でも、TLR4 と TICAM-1 は足場分子として機能する TICAM-2 を介して結合し、下流へのシグナル伝達に必須な役割を担っている。TICAM-1 が活性化する時の挙動を



リアルタイムで観察した結果、TICAM-1 は TLR3 から刺激を受けると細胞内に分子集合体を形成することが分かった(図2)。分子集合体の形成は TICAM-1 を介したシグナル伝達に必須であるが、我々が TICAM-1 シグナロソームと命名したこの分子集合体が形成される仕組みについては未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、TICAM-1 シグナロソーム形成に關する新規の分子を同定することで、TLR3-TICAM-1 経路の活性化の分子機構を明らかにすることを目的とした。図1で示したように TLR3 を介したシグナル伝達は抗ウイルス性の液性因子の活性化や、獲得免疫の活性化につながるクロスプレゼンテーションの活性化に重要な役割を果しており、TICAM-1 シグナロソーム形成の分子機構の解明は自然免疫系の働きを制御する新しい化合物の開発等にも寄与すると考えた。

3. 研究の方法

TICAM-1-シグナロソーム構成成分を単利するため、培養細胞に発現させた TICAM-1 を生化学的手法によって精製した。TICAM-1 シグナロソーム形成能を欠いた変異体 TICAM-1 をネガティブコントロールとして用い、TICAM-1 全長にのみ特異的に結合してくる分子をマスペクトルによって網羅的に同定した(図3)。得られた分子のうち TICAM-1 シグナロソームの形成に關与

する可能性のあるものについて、siRNA を用いたノックダウン実験を行い、TICAM-1 シグナルに対する影響を査定した。さらに、

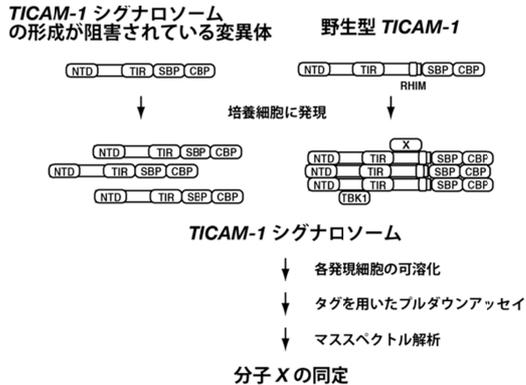


図3: TICAM-1 シグナロソーム構成成分の同定スキーム

TICAM-1 シグナロソーム形成に対して与える影響について解析を行なった。

4. 研究成果

(1) TICAM-1 シグナロソーム構成成分の同定

培養細胞に発現させた TICAM-1 を含む分子集合体を免疫沈降法によって精製した後、マススペクトルによって TICAM-1 シグナロソームに含まれる成分を同定した。シグナロソーム形成能を有する TICAM-1 全長の分子複合体に特異的に含まれる分子を 10 種類以上同定した。その中でも、14-3-3 ファミリーに属する分子が複数同定された。ファミリー遺伝子のなかでも、14-3-3-zeta はもっとも強いシグナルを検出した。また、培養細胞に TICAM-1 と 14-3-3-zeta を共発現させたところ、TICAM-1 と 14-3-3-zeta の直接結合が認められた。

遺伝子名	同定されたペプチドの数	
	TICAM-1-N+TIR-P434H	TICAM-1-WT
14-3-3 protein zeta/delta	0	8
14-3-3 protein theta	0	4
Isoform 1 of Nucleoside diphosphate kinase B	0	4
Putative uncharacterized protein RPL7P23 (Fragment)	0	4
40S ribosomal protein S16	0	3
chaperonin containing TCP1, subunit 3 isoform b	0	3
Endoplasmic	0	3
GTP-binding nuclear protein Ran	0	3
Isoform 1 of Nck-associated protein 1	0	3
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	0	3
T-complex protein 1 subunit zeta	0	3

図4: マススペクトルによって同定された主な TICAM-1 シグナロソーム構成成分

(2) 14-3-3-zeta による TICAM-1 シグナルの制御

14-3-3-zeta が TICAM-1 を介したシグナル伝達に対して与える影響を解析するため、RNAi による 14-3-3-zeta の発現を抑制した。この結果、TLR3-TICAM-1 を介した I 型インターフェロン遺伝子の活性化が 14-3-3 ノックダウン細胞において抑制された。

14-3-3-zeta が TICAM-1 を介したシグナルに及ぼす影響について、下流転写因子の活性化を指標にして調べたところ、IRF-3 の活性化に伴う dimer の形成や核への移行については、部分的な活性化抑制が認められた。一方で、NF- κ B の活性化に必須である I- κ B のリン酸化が、14-3-3-zeta 遺伝子のノックダウンによって顕著に減少していた。これらの 14-3-3-zeta ノックダウンが TICAM-1 シグナルに対して及ぼす影響は、14-3-3-zeta のファミリー分子であり、マススペクトルによる解析で 14-3-3-zeta と同様に検出されていた 14-3-3-theta のノックダウンでは認められず、14-3-3-zeta に特異的な現象であると考えられた。

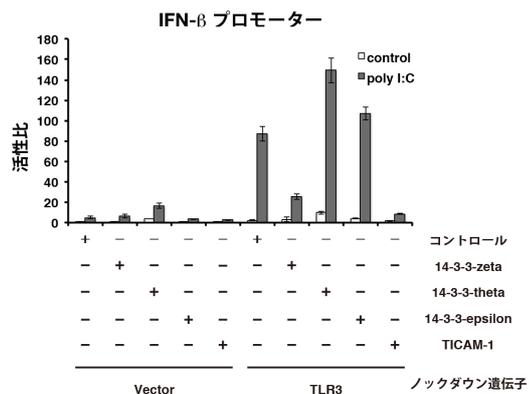


図5: 14-3-3-zeta 遺伝子のノックダウンによる TLR3-TICAM-1 経路を介した I 型インターフェロン産生の抑制

(3) 14-3-3-zeta による TICAM-1 シグナロソーム形成の制御

TICAM-1-GFP を HeLa 細胞に少量発現させた後、TLR3-TICAM-1 pathway を活性化する poly I:C で刺激すると、TICAM-1-signalosome の活性化が経時的に認められる。14-3-3-zeta の発現を事前にノックダウンした細胞で同様の実験を行なったところ、リガンド刺激に伴う TICAM-1 シグ

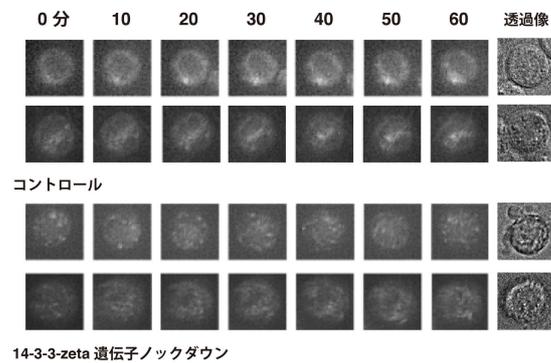


図 5 : 14-3-3-zeta 遺伝子のノックダウンによる
TICAM-1 シグナロソーム形成の抑制

ナロソームの活性化は抑制された。このことから、14-3-3-zeta は TICAM-1 シグナロソームの形成を助けることで、下流のシグナル伝達に寄与していると考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Funami, K., Matsumoto, M., Obuse, C., and Seya, T. (2016). 14-3-3-zeta participates in TLR3-mediated TICAM-1 signal-platform formation. Mol. Immunol. 73, 60-68.

DOI : 10.1016/j.molimm.2016.03.010 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

14-3-3-zeta は TICAM-1 を介したシグナル伝達を正に制御する
舟見健児、松本美佐子、小布施力史、瀬谷司
日本インターフェロン・サイトカイン学会、
2014 年 6 月 19,20 日、北海道大学医学部学友会館フラテホール (北海道・札幌市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

舟見 健児 (FUNAMI, Kenji)

北海道大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号 : 0 0 4 2 1 9 8 3